不同强度快速冷驯化对广聚萤叶甲成虫耐寒性生理指标的影响

岳 雷，周忠实，刘志邦，郭建英*，万方浩

（中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193）

摘要：【目的】快速冷驯化能在短时间内迅速提高昆虫的耐寒性，是昆虫应对外界温度急剧变化以及短时低温胁迫的重要途径。本研究旨在探究入侵杂草豚草 *Ambrosia artemisiifolia* 生防天敌广聚萤叶甲 *Ophraella communa* 对不同强度快速冷驯化的生理响应机制。【方法】分别对广聚萤叶甲成虫进行了不同温度（-4，0，4 和8℃）下4 h及0℃下不同时间（1，4 ，8 和16 h）的快速冷驯化处理，并对其体内的生理物质含量和保护酶活性进行了测定。【结果】除8℃/4 h，0℃/1 h和0℃/8 h外，其余冷驯化处理均使广聚萤叶甲成虫过冷却点显著降低（$P<0.05$），其中0℃/4 h处理组最低。而且，随着冷驯化温度降低、持续时间的增长，广聚萤叶甲成虫体甘油含量以及过氧化氢酶（CAT）、过氧化物酶（POD）和超氧化物歧化酶（SOD）活性呈曲线变化，并于0℃/4 h处理时达到极值，但冷驯化处理对虫体自由水和总糖含量的影响并不显著（$P\geq0.05$）。【结论】广聚萤叶甲快速冷驯化的诱导具有其临界强度值和最适条件，过大强度的驯化处理反而不利于其耐寒性的提高。本研究结果对于深入阐明广聚萤叶甲越冬策略以及人工培育耐寒种群的实践具有一定参考价值。

关键词：广聚萤叶甲；快速冷驯化；耐寒性；生理机制；过冷却点；保护酶

中图分类号：Q966 **文献标识码：**A **文章编号：**0454-6296(2014)06-0631-08

Effects of rapid cold hardening in different intensities on the physiological indices related to cold tolerance in adults of *Ophraella communa* (Coleoptera: Chrysomelidae)

YUE Lei, ZHOU Zhong-Shi, LIU Zhi-Bang, GUO Jian-Ying*, WAN Fang-Hao (State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests/Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract:【Aim】As an effective approach adapting to acute temperature fluctuation and short-term cold shock, rapid cold hardening (RCH) can enhance cold resistance of some insects in a very short period. We explored the physiological mechanisms responding to RCH in different intensities in *Ophraella communa*, which is a promising biological control agent for invasive *Ambrosia artemisiifolia*.【Methods】*O. communa* adults were subjected to different intensities of RCH, including being exposed to -4, 0, 4 and 8℃ for 4 h, or exposed to 0℃ for 1, 4, 8 and 16 h. The contents of cryprotectants and the activities of protective enzymes were measured.【Results】The supercooling point (SCP) of *O. communa* adults was significantly depressed by RCH ($P<0.05$), particularly at 0℃/4 h, with the exception of the groups of 8℃/4 h, 0℃/1 h and 0℃/8 h. With the augment of RCH intensity (decrease of the treated temperature or increase of the sustained time), the glycerol content and the activities of catalase (CAT), peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) changed notably, especially at 0℃/4 h, though water and sugar contents were not significantly changed by RCH.【Conclusion】There exist the threshold and the optimum induction intensity of RCH in *O. communa* adults, and excessive intensities may be harmful for enhancement of cold tolerance in *O. communa* adults. The results are helpful to better understanding the overwintering strategies of *O. communa* and the artificial cultivation of cold-tolerant population.

Key words: *Ophraella communa*; rapid cold hardening; cold tolerance; physiological mechanisms; supercooling point (SCP); protective enzyme

---

基金项目：国家自然科学基金项目（31170392）；国家重点基础研究发展计划（“973”计划）项目（2009CB119200）

作者简介：岳雷，男，1988 年生，山东聊城人，硕士研究生，研究方向为入侵生物学和生物防治，E-mail：nongda-yuelei@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: guojy@mail.caas.net.cn

收稿日期 Received: 2014-02-24；接受日期 Accepted: 2014-05-22

快速冷驯化(rapid cold hardening, RCH)是指将昆虫暴露于亚致死低温下几小时,甚至几十分钟便可显著提高其致死低温存活率的过程和现象(Lee *et al*., 1987; McDonald *et al*., 1997; Teets and Denlinger, 2013)。由于对耐寒性调节的高效性,快速冷驯化通常被认为是昆虫适应外界温度急剧变化、昼夜气温改变以及短期低温暴露的一种重要策略(Coulson and Bale, 1990)。近年来,随着全球气候变化愈演愈烈,局部极端气候现象频繁发生,昆虫对异常温度的适应机制引起了人们的广泛关注,而快速冷驯化也成为了当前昆虫耐寒性理论和应用基础研究的热点(Bale *et al*., 2002; Qiang *et al*., 2008; Basson *et al*., 2011)。

快速冷驯化对昆虫重要的生态适应意义虽已得到人们的普遍认同,但对其生理代谢机制还知之甚少(Teets *et al*., 2008)。当前对于昆虫快速冷驯化机制的研究主要涉及到:抗冻保护物质(多元醇、油脂、糖类以及游离氨基酸等)在体液的积累,细胞膜成分和特性的改变(如膜脂不饱和度的增加、膜流动性的增加以及磷脂头基成分的改变等),膜内外离子梯度的调节,第二信使通路(丝裂原活化蛋白激酶信号、细胞凋亡信号和钙离子信号等)的诱导以及热激蛋白的表达等(孔璐等,2012;Teets and Denlinger, 2013; 岳雷等,2013)。此外,有研究表明,氧化胁迫是冷伤害的重要原因之一,昆虫体内抗氧化保护酶系[超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)等]活性的提高可及时有效地清除活性氧自由基,保护细胞成分的结构和功能,从而在快速冷驯化低温耐受提高以及冷伤害修复中发挥着重要作用(Robert and Leopold, 1996; Jing *et al*., 2005; 赵静等,2010;Lalouette *et al*., 2011;强承魁等,2012b)。

研究表明,快速冷驯化具有其临界诱导值,即在一定范围内,昆虫耐寒性随着快速冷驯化的强度(驯化温度或持续时间)的增强而迅速提高,但超过某种强度的冷驯化却可能造成昆虫耐寒能力的下降甚至导致死亡(Coulson and Bale, 1990; Wang and Kang, 2003)。这是因为过强的低温冷暴露会对昆虫造成冷胁迫伤害(cold injury),并在一定程度上抵消驯化对耐寒性提高的效果。进一步研究发现,冷驯化对昆虫耐寒性改善的效果具有其最佳的温度和时间组合,且因昆虫种类、种群来源乃至发育阶段不同而存在显著差异(Jing and Kang, 2003; Terblanche *et al*., 2007; Marais *et al*., 2009)。因此,探究影响昆虫冷驯化效果的因素,建立冷驯化相关模型乃至摸索冷驯化的最优条件,对于昆虫耐寒性研究的理论和实践均有重要意义。

广聚萤叶甲 *Ophraella communa* 是世界性入侵杂草豚草 *Ambrosia artemisiifolia* 的一种重要生防天敌,自 2001 年于我国南京地区发现以来,目前已广泛分布于华南、华中、华东的我国大部分豚草入侵区域(Zhou *et al*., 2010)。研究表明,广聚萤叶甲对寒冷的耐受能力较弱,向我国北方地区进一步扩散的速度较为缓慢,从而一定程度上限制了其对当地豚草的防控(周忠实等,2008;Zhou *et al*., 2010)。可喜的是,前期的研究发现较短时间的低温驯化可有效提高广聚萤叶甲成虫在致死低温下的存活率(Zhou *et al*., 2011),从而暗示了广聚萤叶甲的低温耐受具有较强的生态可塑性,具备进一步向我国北方迁移扩散的潜力,同时也为人工驯化耐寒种群提供了可供探索的途径。但是,对于广聚萤叶甲快速冷驯化的内在生理机制以及影响因素目前尚未了解清楚。

鉴于此,本实验主要进行了不同强度快速冷驯化对广聚萤叶甲耐寒性影响的研究,即探究了处理温度高低和持续时间长短对其耐寒性提升效果(以过冷却点作为衡量指标)的差异,并对冷驯化前后体内自由水、甘油、油脂和总糖等生理物质含量以及保护酶活性变化进行了定量测定,以期为广聚萤叶甲耐寒性和冷驯化研究的理论和实践提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

广聚萤叶甲成虫于 2013 年 9 月上旬采自中国农业科学院廊坊科研中试基地试验田(39°30′42″N, 116°36′07″E),室内(温度 26 ± 1℃, RH 70% ± 10%,光周期 14L:10D)用清洁豚草植株饲养至翌代个体开始化蛹后,每日收集 12 h 内的虫蛹至带有气窗(5 cm × 10 cm,由 40 目纱网制作而成)的透明塑料盒(19 cm × 12 cm × 6 cm)中,并转入温度 20℃, RH 70%,光周期 12L:12D 的人工气候培养箱,直至羽化为成虫。每日定期挑出新羽化成虫,鉴别雌雄后,用新鲜豚草枝条分开饲养,7 d 后选用健康个体用于实验。

1.2　广聚萤叶甲成虫的快速冷驯化处理

1.2.1　不同温度的快速冷驯化处理：随机挑选 7 日龄健康的未交配成虫（♀∶♂ =1∶1）20 头集中放置于顶端用纱网覆盖的直径 10 cm 的塑料培养皿中，并分别作 −4℃/4 h，0℃/4 h，4℃/4 h 和 8℃/4 h 的快速冷驯化处理，以室温 20℃正常饲养的个体作为对照，实验重复 3 次。冷驯化处理后，除了 25 头成虫用于过冷却点的测定外，其余试虫置于 −80℃冻存备用。

1.2.2　不同时间的快速冷驯化处理：随机挑选 7 日龄健康的未交配成虫 80 头，每 20 头（♀∶♂ =1∶1）设为一个处理，置于 0℃的低温培养箱中，分别于 1，4，8 和 16 h 后取出，设置室温 20℃的处理作为对照，实验重复 3 次。冷驯化处理后，取 25 头试虫用于过冷却点测定，其余于 −80℃冻存。

1.3　过冷却点的测定

利用 SUN-Ⅱ型智能昆虫过冷却点测定仪（中航光电科技股份有限公司）测定试虫的过冷却点。将温度敏感探头置于试虫腹部，用胶带固定后放入 −25℃冰箱中，探头温度以 1℃/min 的速率逐渐下降，根据所连记录仪显示曲线的变化确定试虫的过冷却点。每处理测定 25 头成虫。

1.4　虫体含水量的测定

将驯化处理后的成虫由 −80℃低温冰箱中取出，充分吸干体表水分后，测定单头虫体湿重（wet weight，WW），后置于 65℃烘箱中持续干燥 48 h，测定干重（dry weight，DW）。虫体含水量的计算方法为：（WW − DW）/WW × 100%。每个处理 25 次重复。

1.5　甘油和油脂含量的测定

标准曲线绘制以及虫体甘油、油脂的提取和含量测定参照仵均祥（2002）、丁惠梅（2011）和 Van Handel（1985）的方法，并适当改进。将单头烘干已测定重量的试虫置于 1.5 mL 的离心管中，加液氮充分研磨后，再加入 1 mL 的蒸馏水，混匀后，5 000 r/min 离心 10 min，移取上清液于另一离心管。在原管中加入 500 μL 水，再离心一次后合并上清液，混匀后，取 1 mL 用于测定甘油，而原离心管中的残渣则用于测定油脂含量。向剩余虫体残渣中加入 800 μL 氯仿/甲醇（1∶2，v/v）的混合溶液，充分振荡，14 000 r/min 离心 5 min 后，取上清液于另一管中，再加入 600 μL 的蒸馏水，摇匀，14 000 r/min 再次离心 5 min。去掉上清液，便可得到溶于氯仿甲醇的油脂。提取的虫体甘油、油脂测定方法同标准曲线的制作，其中每实验处理甘油和油脂各重复 10 次。

1.6　总糖含量的测定

标准曲线绘制和虫体总糖的提取、测定参照仵均祥等（2004）的方法。将 −80℃冷冻并准确称重的试虫取出后，单头置于 1.5 mL 离心管中充分研磨，加入 1 mL 水冲洗研磨棒，后加入 500 μL 的 10%三氯乙酸，摇匀，1 000 r/min 离心 10 min，移取上清液于 5 mL 的离心管，加入 1 mL 10%三氯乙酸再冲洗、离心一次，合并上清液。充分摇匀后，吸取 1 mL 测定总糖含量，方法同标准曲线。每处理重复 10 次。

1.7　保护酶活性的测定

酶液的制备：取 −80℃冷冻并准确测定湿重的虫体，单头加液氮充分研磨后，加入 600 μL 的生理盐水（0.9% NaCl 溶液）摇匀，制备成组织匀浆，2 500 r/min离心 10 min 后，取上清液进行酶活性的测定。

保护酶活性的测定：采用 CAT，POD 和 SOD 标准试剂盒（南京建成公司），并按说明书分别进行定量测定。每种酶重复测定 6 次。

1.8　数据统计与分析

采用 SAS 9.1.3 统计分析软件对各实验处理得到的数据进行单因素方差分析（One-Way ANOVA）和 LSD 法多重比较（$P<0.05$）。

2　结果与分析

2.1　不同强度快速冷驯化对广聚萤叶甲成虫过冷却点的影响

快速冷驯化对广聚萤叶甲成虫过冷却点的影响随驯化强度而异。除 8℃/4 h，0℃/1 h 和 0℃/8 h 外，其他快速冷驯化处理均使得广聚萤叶甲成虫过冷却点明显降低（图 1，$F_{4,120}=3.44$，$P=0.0107$；图 2，$F_{4,120}=4.82$，$P=0.0012$）。与对照相比，0℃/4 h 的快速冷驯化使成虫过冷却点降低了 24.3%。8℃/4 h 和 0℃/1 h 的驯化效果不显著，可能是由于该处理强度尚未达到快速冷驯化诱导的临界值。而 −4℃/4 h 和 0℃/8 h 处理时的过冷却点则相对 0℃/4 h 有所上升，表明超出某种强度的冷驯化处理不利于广聚萤叶甲成虫耐寒性的提高。

2.2　不同强度快速冷驯化对广聚萤叶甲成虫自由水含量的影响

所有的快速低温驯化处理均未显著改变广聚萤

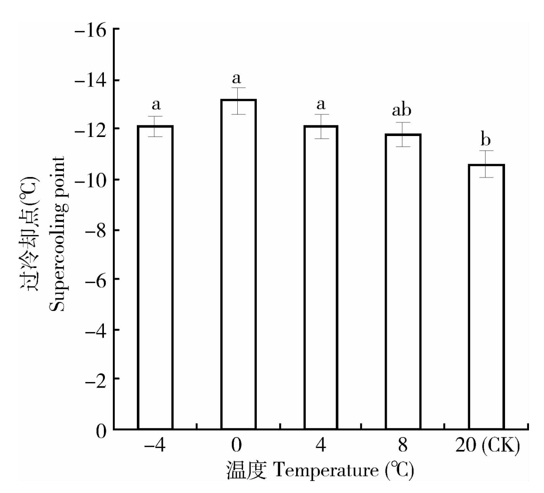


图 1　不同温度持续 4 h 的快速冷驯化(RCH)对广聚萤叶甲成虫过冷却点的影响

Fig. 1　Effect of rapid cold hardening (RCH) at different temperatures for 4 h on supercooling point in *Ophraella communa* adults

数据为平均数 ± 标准误;柱上不同小写字母表示处理间差异显著(LSD 法, $P < 0.05$);图 2 ~ 4 同。Data are means ± *SE*; different lowercase letters above bars mean significant difference among treatments at $P < 0.05$ by LSD test. The same for Figs. 2 – 4.

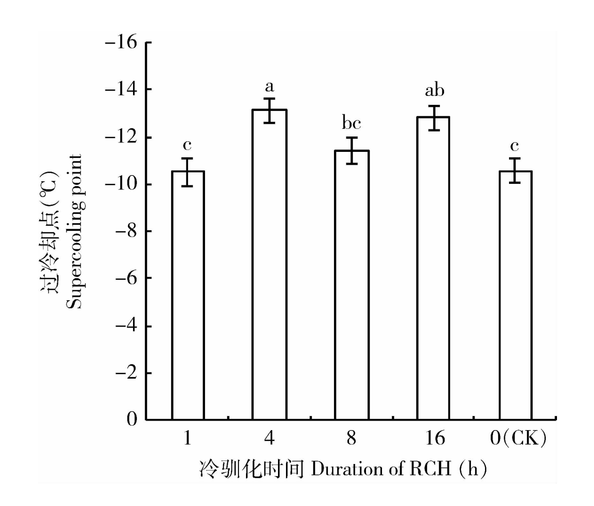


图 2　0℃下不同时间的快速冷驯化(RCH)对广聚萤叶甲成虫过冷却点的影响

Fig. 2　Effect of rapid cold hardening (RCH) at 0℃ for different periods on supercooling point in *Ophraella communa* adults

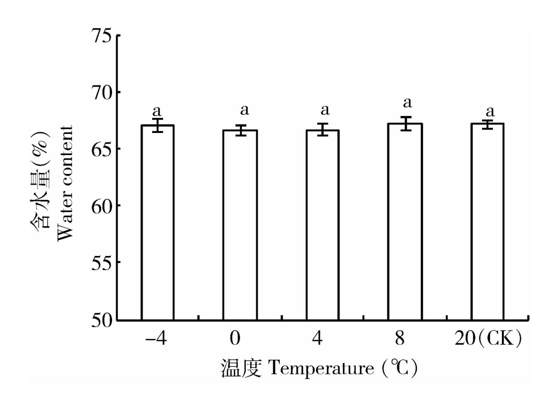


图 3　不同温度持续 4 h 的快速冷驯化(RCH)对广聚萤叶甲成虫含水量的影响

Fig. 3　Effect of rapid cold hardening (RCH) at different temperatures for 4 h on water content in *Ophraella communa* adults

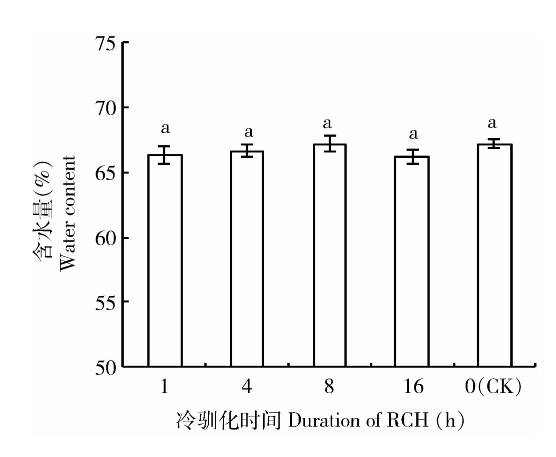


图 4　0℃下不同时间的快速冷驯化(RCH)对广聚萤叶甲成虫含水量的影响

Fig. 4　Effect of rapid cold hardening (RCH) at 0℃ for different periods on water content in *Ophraella communa* adults

叶甲成虫体含水量(图 3, $F_{4,120} = 0.33$, $P = 0.8602$; 图 4, $F_{4,120} = 0.8$, $P = 0.5258$)。从而表明,短时间的低温胁迫没有引起广聚萤叶甲成虫体内水分代谢发生明显变化。

2.3　不同强度快速冷驯化对广聚萤叶甲成虫总糖、油脂和甘油含量的影响

经不同温度冷驯化处理的广聚萤叶甲成虫体内总糖含量与对照间无显著差异(图 5,总糖: $F_{4,45} = 1.43$, $P = 0.2393$),而不同时间快速冷驯化处理间存在显著性差异(图 6,总糖: $F_{4,44} = 2.89$, $P = 0.0329$)。可以推断快速冷驯化是一个依赖时间的渐进过程,冷驯化生理代谢的调节可及时补充成虫体内糖类物质的消耗。

除 0℃/1 h 外,其他各冷驯化处理的油脂含量均明显低于对照(图 5,油脂: $F_{4,42} = 9.62$, $P < 0.01$; 图 6,油脂: $F_{4,41} = 9.54$, $P < 0.01$)。表明冷驯化处理加快了广聚萤叶甲成虫体内油脂的分解代谢。

多数冷驯化处理的广聚萤叶甲成虫体内甘油含量较对照有所增高(图 5,甘油: $F_{4,46} = 4.23$, $P = 0.0054$; 图 6,甘油: $F_{4,46} = 4.95$, $P = 0.0021$),其中最大增幅达 30% 以上。随着快速冷驯化强度的增加(处理温度降低及持续时间延长),成虫体内甘油的含量呈现曲线变化,并于 0℃/4 h 达到最高值。

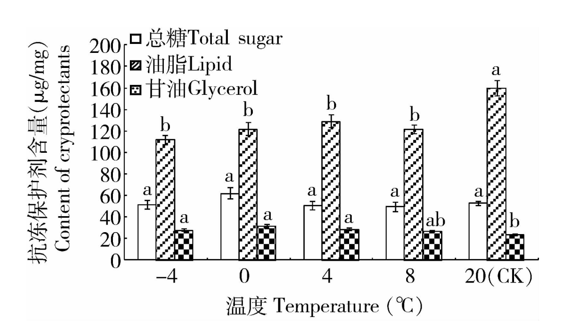


图 5　不同温度持续 4 h 的快速冷驯化(RCH)对广聚萤叶甲成虫抗冻保护剂含量的影响

Fig. 5　Effect of rapid cold hardening (RCH) at different temperatures for 4 h on the content of cryprotectants in *Ophraella communa* adults

数据为平均数±标准误；柱上不同的小写字母表示相同物质的不同处理间差异显著(LSD 法，$P<0.05$)；图 6 同。Data are means ± *SE*; Different lowercase letters above bars show significant difference among treatments for the same substance at $P<0.05$ by LSD test. The same for Fig. 6.

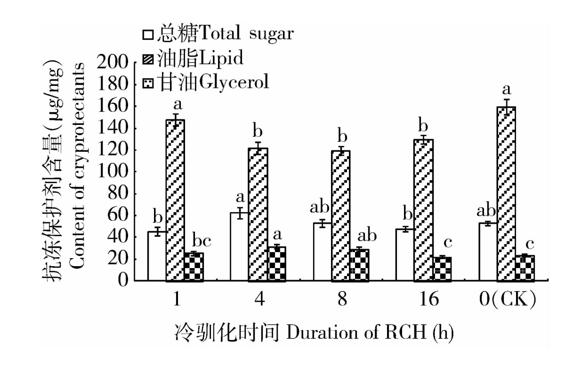


图 6　0℃下不同时间的快速冷驯化对广聚萤叶甲成虫抗冻保护剂含量的影响

Fig. 6　Effect of rapid cold hardening (RCH) at 0℃ for different periods on the content of cryprotectants in *Ophraella communa* adults

由此推测，甘油合成代谢对于广聚萤叶甲冷驯化过程具有重要意义。

2.4　不同强度快速冷驯化对广聚萤叶甲成虫保护酶活性的影响

随着冷驯化处理温度的降低以及持续时间的延长，广聚萤叶甲成虫体内 CAT 和 SOD 保护酶活性均呈先上升而后下降的趋势(表 1，2)，且在 0℃/4 h 处理的活性达到最高值(分别比对照提高 46.6% 和 24.7%)，而 POD 酶活性则表现出与之相反的变化。这表明广聚萤叶甲可根据冷驯化强度自发调控体内保护酶系的活性水平，最大程度降低低温胁迫对细胞的伤害。

表 1　不同温度持续 4 h 的快速冷驯化(RCH)对广聚萤叶甲成虫保护酶活性的影响

Table 1　Effect of rapid cold hardening (RCH) at different temperatures for 4 h on the activities of protective enzymes in *Ophraella communa* adults

冷驯化温度(℃) Cold-hardening temperature	CAT 活性(U/g) CAT activity	POD 活性(U/g) POD activity	SOD 活性(U/g) SOD activity
-4	28.21±1.73 bc	373.47±24.50 c	2 376.96±392.05 c
0	37.57±2.89 a	318.76±11.57 c	6 202.97±164.71 a
4	34.21±2.81 ab	384.84±10.73 c	5 940.79±339.63 a
8	22.56±2.38 c	684.39±43.27 a	4 424.37±195.38 b
20 (CK)	25.63±1.86 c	482.10±22.99 b	4 972.56±202.62 b

表中数据为平均数±标准误；不同小写字母表示同列数据间差异显著(LSD 法，$P<0.05$)；表 2 同。Data in the table are means ± *SE*. Different lowercase letters indicate significant difference among the data in the same column at $P<0.05$ by LSD test. The same for Table 2.

表 2　0℃下不同时间的快速冷驯化(RCH)对广聚萤叶甲成虫保护酶活性的影响

Table 2　Effect of rapid cold hardening (RCH) at 0℃ for different periods on the activities of protective enzymes in *Ophraella communa* adults

冷驯化时间(h) Duration of RCH	CAT 活性(U/g) CAT activity	POD 活性(U/g) POD activity	SOD 活性(U/g) SOD activity
1	25.94±2.11 b	408.82±15.92 b	5 138.05±164.01 b
4	37.57±2.89 a	318.76±11.57 c	6 202.97±164.71 a
8	24.30±1.55 b	542.45±36.13 a	5 419.63±143.46 b
16	20.61±5.17 b	487.07±32.48 ab	4 235.03±329.18 c
0 (CK)	25.63±1.86 b	482.10±22.99 ab	4 972.56±202.62 b

3　讨论

3.1　不同强度快速冷驯化对广聚萤叶甲耐寒性的影响

及时有效的生理代谢调控是温带昆虫应对环境温度剧烈变化的重要前提。研究发现，自然界昆虫主要采取两种策略来抵御冬季低温的胁迫，一种是可忍受胞外结冰的结冰耐受型(freezing tolerant)，另一种则是通过降低过冷却点而避免体液结冰的结冰敏感型(freezing susceptible or freezing intolerant)。研究表明，不同季节种群广聚萤叶甲的过冷却点差异显著，且当外界温度低于过冷却点时即出现大量死亡，属于结冰敏感型昆虫。因此，过冷却点的降低对广聚萤叶甲的寒冷适应和越冬存活意义重大。

本研究发现，短时间的低温冷驯化可使广聚萤叶甲过冷却点显著降低，这与 Worland 和 Convey

(2001)对南极螨虫 *Alaskozetes antarcticus* 以及李兴鹏等(2012)对蠋蝽 *Arma chinensis* 的研究基本一致，但与 Wang 和 Kang 等(2003)对东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 以及冯从经等(2007)对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 的研究结果不同,这可能是冷驯化对昆虫过冷却点的影响具有种间特异性。显然,过冷却点的降低有助于广聚萤叶甲在致死低温下的存活以及耐受低温的范围增大(Zhou *et al.*, 2011)。

昆虫快速冷驯化是一般具有特定的临界诱导值,因此需要一定程度的低温及一定低温持续时间才能提高昆虫的耐寒性。如,4℃驯化 4 h 的处理可显著提高蠋蝽在 -10℃下的存活率,而 10℃/4 h 和 15℃/4 h 驯化处理与对照相比差异并不明显(李兴鹏等,2012)。这种现象也在红尾肉蝇 *Sarcophaga crassipalpis*(Lee, 1987)、橄榄果蝇 *Bactrocera oleae*(Koveos, 2001)和东亚飞蝗(Wang and Kang, 2005)等很多昆虫的研究中被发现和报道。此外,大量研究表明超出某种强度的快速冷驯化处理对昆虫耐寒性会产生不利影响(Jing and Kang, 2003; Terblanche *et al.*, 2007; 任璐等,2007;马延龙等,2009),这可能与持续低温驯化对昆虫造成的胁迫累积有关。我们发现随着冷驯化处理温度的降低和持续时间的延长,广聚萤叶甲的耐寒性呈现先升后降的变化趋势,并于 4℃ 驯化 4 h 时耐寒性达到最高。另外值得注意的是,相对于0℃/8 h,0℃下 16 h 驯化的广聚萤叶甲过冷却点反而有所降低,这可能是因为 16 h 的持续时间较长,已经接近长时冷驯化的范畴,而研究普遍认为昆虫的长时冷驯化具有与快速冷驯化不同的作用机制(McDonald *et al.*, 1997; Ovargaad *et al.*, 2007)。

3.2 广聚萤叶甲快速冷驯化的生理代谢调控机制

昆虫冷驯化通常涉及一系列复杂的生理代谢调控,一方面,持续低温胁迫会加速糖酵解进程从而为昆虫体内各项生理调控提供充足的能量(Chen and Denlinger, 1990; Michaud and Denlinger, 2007);另一方面,短时间的低温驯化可导致昆虫体内糖类、多羟基醇等一些耐寒相关的低分子量物质[常称为抗冻保护剂(cryoprotectants)]的大量累积,用于依数性地降低过冷却点(Zachariassen, 1985; Lee, 1987)、防止细胞过度脱水(Williams *et al.*, 2002)以及稳定细胞膜和蛋白质结构(Crowe *et al.*, 1987)等。研究发现,快速冷驯化诱导抗冻保护剂含量累积在不同种类的昆虫间具有其特定的模式(Chen *et al.*, 1987, 1991; Kelty and Lee, 2001; Misener *et al.*, 2001; 强承魁等,2012b)。

与强承魁等(2012b)关于快速冷驯化可明显降低二化螟 *Chilo suppressalis* 滞育幼虫体内含水量的报道不同,本实验未发现低温诱导显著影响广聚萤叶甲自由水含量的相关证据。这可能是由于短时间的低温驯化不足以引起广聚萤叶甲体内水分代谢的显著改变,类似的结果见于李兴鹏等(2012)对蠋蝽的研究。除 0℃下 1 h 和 16 h 驯化处理外,其他强度的低温诱导均未引起广聚萤叶甲体内总糖含量的明显改变,但却导致油脂含量的显著降低。据此推测,快速冷驯化能够促进广聚萤叶甲体内油脂分解代谢的进程,为直接能量供应者糖类物质的合成提供原料,以便及时补充氧化供能时糖类的消耗,保证能量的持续产生。而长时间低温胁迫引起相关代谢酶系活性的降低可能是造成 0℃/16 h 驯化时糖类含量有所下降的重要原因。

甘油被认为是昆虫体内最重要的抗冻保护物质,快速冷驯化引起甘油含量累积的现象也在多种昆虫中被发现(Chen *et al.*, 1987; Wang and Kang, 2005; Ishiguro *et al.*, 2007; 李兴鹏等, 2012)。本研究也发现随着冷驯化强度的改变,广聚萤叶甲体内甘油含量和过冷却点表现出相似的变化趋势,从而初步证实了甘油对该叶甲快速冷驯化过冷却点降低的重要作用。

3.3 不同强度快速冷驯化对广聚萤叶甲体内保护酶活性的影响

持续的低温胁迫会诱使昆虫细胞内产生 O_2^- 和 OH · 等活性自由基,若不能得到及时清除,可能会破坏昆虫许多生物分子的结构和功能,并引起新陈代谢的紊乱(李周直等,1994; 赵静等,2010)。而昆虫体内存在一系列的保护酶,可及时清除活性氧自由基和其他过氧化物,避免其对机体的毒害。其中,CAT,POD 和 SOD 是昆虫体内最重要的 3 种保护酶,其活性的高低对于生命代谢活动的正常进行至关重要。本研究发现,快速冷驯化可显著影响广聚萤叶甲体内 3 种保护酶的活性。如,随着快速冷驯化强度的增加,CAT 和 SOD 活性呈现先增后减的趋势,而 POD 酶活性则出现了与之相反的变化。这说明 CAT,POD 和 SOD 保护酶对不同强度低温胁迫的响应各异,而又处于动态平衡,机体通过对 3 种酶活性的综合调控最大程度地缓解冷胁迫对细胞的毒害以及膜脂的过氧化作用(强承魁等,2012a)。

综上所述,快速冷驯化提高广聚萤叶甲耐寒性是一个涉及到多种代谢调控的复杂过程,且具有其

特定的诱导条件和强度范围。在今后的研究中，除了需要进一步探索其内在的生理生化及分子调控机制外，还应当考虑将各种环境因子对冷驯化的交互效应和昆虫的生态适应性结合起来，以期全面揭示快速冷驯化重要的进化意义。

参考文献（References）

Bale JS, Master GJ, Hodkinson ID, Awmack C, Bezemer TM, Brown VK, Butterfield J, Buse A, Coulson JC, Farrar J, Good JEG, Harrington R, Hartley S, Jones TH, Lindroth RL, Press MC, Symrnioudis I, Watt AD, Whittaker JB, 2002. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biology*, 8: 1 – 16.

Basson CH, Nyamukondiwa C, Terblanche JS, 2011. Fitness costs of rapid cold-hardening in *Ceratitis capitata*. *Evolution*, 66 (1): 296 – 304.

Chen CP, Denlinger DL, 1990. Activation of phosphorylase in response to cold and heat stress in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *Journal of Insect Physiology*, 36(8): 549 – 553.

Chen CP, Denlinger DL, Lee RE, 1987. Cold-shock injury and rapid cold hardening in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *Physiological Zoology*, 60(3): 297 – 304.

Chen CP, Lee RE, Denlinger DL, 1991. Cold shock and heat shock: a comparison of the protection generated by brief pretreatment at less severe temperatures. *Physiological Entomology*, 16(1): 19 – 26.

Coulson SJ, Bale JS, 1990. Characterization and limitations of the rapid cold-hardening response in the housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Journal of Insect Physiology*, 36(3): 207 – 211.

Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Wistrom CA, 1987. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochemical Journal*, 242: 1 – 10.

Ding HM, 2011. Study on Dynamic Changes of Biochemical Indices of the Peach Fruit Moth (*Carposina sasakii* Matsumura) during Diapause Period. MSc Thesis, Beijing Forestry University, Beijing. ［丁惠梅，2011. 桃小食心虫滞育期间生化指标含量的动态变化. 北京：北京林业大学硕士学位论文］

Feng CJ, Lv WJ, Dong QA, Chen J, Fu WJ, 2007. Effect of low temperature treatment on larvae of the Asia corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Entomologica Sinica*, 50(1): 1 – 6. ［冯从经，吕文静，董秋安，陈俊，符文俊，2007. 低温处理对亚洲玉米螟幼虫抗寒性的诱导效应. 昆虫学报，50(1): 1 – 6］

Ishiguro S, Li YP, Nakano K, Tsumuki H, Goto M, 2007. Seasonal changes in glycerol content and cold hardiness in two ecotypes of the rice stem borer, *Chilo suppressalis*, exposed to the environment in the Shonai district, Japan. *Journal of Insect Physiology*, 53 (4): 392 – 397.

Jing XH, Kang L, 2003. Geographical variation in egg cold hardiness: a study on the adaptation strategies of the migratory locust *Locusta migratoria* L. *Ecological Entomology*, 28: 151 – 158.

Jing XH, Wang XH, Kang L, 2005. Chill injury in the eggs of the migratory locust, *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae): the time-temperature relationship with high-temperature interruption. *Insect Science*, 12: 171 – 178.

Kelty JD, Lee RE, 2001. Rapid cold-hardening of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) during ecologically based thermo periodic cycles. *Journal of Experimental Biology*, 204: 1659 – 1666.

Kong L, Guo JY, Zhou ZS, Wan FH, 2012. Progress in research on cold hardening in insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49 (6): 1664 – 1669. ［孔璐，郭建英，周忠实，万方浩，2012. 昆虫冷驯化机制研究进展. 应用昆虫学报，49(6): 1664 – 1669］

Koveos DS, 2001. Rapid cold hardening in the olive fruit fly *Bactrocera oleae* under laboratory and field conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 101: 257 – 263.

Lalouette L, Williams CM, Hervant F, Sinclair BJ, Renault D, 2011. Metabolic rate and oxidative stress in insects exposed to low temperature thermal fluctuations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 158: 229 – 234.

Lee RE, Chen CP, Denlinger DL, 1987. A rapid cold-hardening process in insects. *Science*, 238: 1415 – 1417.

Li XP, Song LW, Zhang HH, Chen YQ, Zuo TT, Wang J, Sun W, 2012. Responses of *Arma chinensis* cold tolerance to rapid cold hardening and underlying physiological mechanisms. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 23 (3): 791 – 797. ［李兴鹏，宋丽文，张宏浩，陈越渠，左彤彤，王君，孙伟，2012. 蠋蝽抗寒性对快速冷驯化的响应及其生理机制. 应用生态学报，23(3): 791 – 797］

Li ZZ, Shen HJ, Jiang QG, Ji BZ, 1994. A study on the activities of endogenous enzymes of protective system in some insects. *Acta Entomologica Sinica*, 37(4): 399 – 403. ［李周直，沈惠娟，蒋巧根，嵇保中，1994. 几种昆虫体内保护酶系统活力的研究. 昆虫学报，37(4): 399 – 403］

Marais E, Terblanche JS, Chown SL, 2009. Life stage-related differences in hardening and acclimation of thermal tolerance traits in the kelp fly, *Paractora dreuxi* (Diptera, Helcomyzidae). *Journal of Insect Physiology*, 55(4): 336 – 343.

Ma YL, Hou F, Ma J, 2009. Seasonal changes in cold tolerance of desert beetle *Anatolica polita borealis* (Coleoptera: Tenebrionidae) and their physiological mechanisms. *Acta Entomologica Sinica*, 52 (4): 372 – 379. ［马延龙，候凤，马纪，2009. 荒漠昆虫光滑鳖甲的耐寒性季节变化及其生理机制. 昆虫学报，52(4): 372 – 379］

McDonald JR, Bale JS, Walters KFA, 1997. Rapid cold hardening in the western flower thrips *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Insect Physiology*, 43(8): 759 – 766.

Michaud MR, Denlinger DL, 2007. Shifts in the carbohydrate, polyol, and amino acid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated cold-hardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): a metabolomic comparison. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic and Environmental Physiology*, 177: 753 – 763.

Misener SR, Chen CP, Walker VK, 2001. Cold tolerance and proline metabolic gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 47: 393 – 400.

Overgaard J, Malmendal A, Sørensen JG, Bundy JG, Loeschcke V,

Nielsen NC, Holmstrup M, 2007. Metabolomic profiling of rapid cold hardening and cold shock in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 53: 1218 - 1232.

Qiang CK, Du YZ, Yu LY, Cui YD, Zheng FS, Lu MX, 2008. Effect of rapid cold hardening on the cold tolerance of the larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker). *Agricultural Sciences in China*, 7(3): 321 - 328.

Qiang CK, Du YZ, Yu LY, Qin YH, Feng WJ, 2012a. Effects of temperature stress on physiological indices of *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae) diapause larvae. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 23(5): 1365 - 1369. [强承魁, 杜予州, 于玲雅, 秦越华,凤舞剑, 2012a. 温度胁迫对二化螟滞育幼虫生理指标的影响. 应用生态学报, 23(5): 1365 - 1369]

Qiang CK, Yu LY, Du YZ, Qin YH, Zhao H, Hu CX, 2012b. Physiological effects of rapid cold hardening on diapause larvae of rice stem borers, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Chinese Journal of Rice Science*, 26(2): 251 - 254. [强承魁, 于玲雅, 杜予州, 秦越华, 赵虎, 胡长效, 2012b. 快速冷耐受对水稻二化螟滞育幼虫的生理效应. 中国水稻科学, 26(2): 251 - 254]

Ren L, Lu YY, Zeng L, 2007. Cold hardiness of pupae and over-wintering adults from natural populations of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) in China. *Acta Entomologica Sinica*, 50(6): 588 - 596. [任璐, 陆永跃, 曾玲, 2007. 桔小实蝇自然种群蛹和越冬成虫的耐寒性. 昆虫学报, 50(6): 588 - 596]

Robert RR, Leopold RA, 1996. Chilling injury in the housefly: evidence for the role of oxidative stress between pupariation and emergence. *Cryobiology*, 33: 447 - 458.

Teets NM, Denlinger DL, 2013. Physiological mechanisms of seasonal and rapid cold-hardening in insects. *Physiological Entomology*, 38(2): 1 - 12.

Teets NM, Elnitsky MA, Benoit JB, Lopez-MG, Denlinger DL, Lee RE, 2008. Rapid cold-hardening in larvae of the Antarctic midge *Belgica antarctica*: cellular cold-sensing and a role for calcium. *American Journal of Physiology*: *Regulatory*, *Integrative and Comparative Physiology*, 294: 1938 - 1946.

Terblanche JS, Marais E, Chown SL, 2007. Stage-related variation in rapid cold hardening as a test of the environmental predictability hypothesis. *Journal of Insect Physiology*, 53(5): 455 - 462.

Wang HS, Kang L, 2005. Effect of cooling rates on the cold hardiness and cryoprotectant profiles of locust eggs. *Cryobiology*, 51: 220 - 229.

Wang XH, Kang L, 2003. Rapid cold hardening in young hoppers of the migratory locust *Locusta migratoria* L. (Orthoptera: Acridiidae). *CryoLetters*, 24: 331 - 340.

Williams JB, Shorthouse JD, Lee RE, 2002. Extreme resistance to desiccation and microclimate-related differences in cold-hardiness of gall wasps (Hymenoptera: Cynipidae) overwintering on roses in southern Canada. *Journal of Experimental Biology*, 205: 2115 - 2124.

Worland MR, Convey P, 2001. Rapid cold hardening in Antarctic microarthropods. *Functional Ecology*, 15: 515 - 524.

Wu JX, 2002. Relationship between Diapause and Change of Chemical Substance in the Wheat Blossom Midge, *Sitodiplosis mosellana*. PhD Dissertation, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi. [仵均祥, 2002. 麦红吸浆虫滞育与化学物质变化研究. 陕西杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文]

Wu JX, Yuan F, Su L, 2004. Change of carbohydrate contents in larvae of the wheat midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) during mature and diapause stage. *Acta Entomologica Sinica*, 47(2): 178 - 183. [仵均祥, 袁锋, 苏丽, 2004. 麦红吸浆虫幼虫滞育期间糖类物质变化. 昆虫学报, 47(2): 178 - 183]

Van Handel E, 1985. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 1(3): 302 - 304.

Yue L, Guo JY, Zhou ZS, Wan FH, 2013. Effects of cold acclimatization on insect cold hardiness and fitness. *Chinese Journal of Biological Control*, 29(2): 286 - 293. [岳雷, 郭建英, 周忠实, 万方浩, 2013. 冷驯化对昆虫耐寒性及其适合度的影响. 中国生物防治学报, 29(2): 286 - 293]

Zachariassen KE, 1985. Physiology of cold tolerance in insects. *Physiological Reviews*, 65(4): 799 - 832.

Zhao J, Chen ZZ, Qu JJ, Zhang F, Yin XC, Xu YY, 2010. Responses of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) adults to cold acclimation and the related changes of activities of several enzymes in their bodies. *Acta Entomologica Sinica*, 53(2): 147 - 153. [赵静, 陈珍珍, 曲建军, 张帆, 印象初, 许永玉, 2010. 异色瓢虫成虫冷驯化反应及体内几种酶活力的相关变化. 昆虫学报, 53(2): 147 - 153]

Zhou ZS, Guo JY, Ai HM, Li M, Wan FH, 2011. Rapid cold-hardening response in *Ophraella communa* LeSage (Coleoptera: Chrysomelidae), a biological control agent of *Ambrosia artemisiifolia* L. *Biocontrol Science and Technology*, 21(1): 215 - 224.

Zhou ZS, Guo JY, Chen HS, Wan FH, 2010. Effects of temperature on survival, development, longevity and fecundity of *Ophraella communa* (Coleoptera: Chrysomelidae), a potential biological control agent against invasive ragweed, *Ambrosia artemisiifolia* L. (Asterales: Asteraceae). *Environmental Entomology*, 39(3): 1021 - 1027.

Zhou ZS, Guo JY, Wan FH, Chen HS, Peng ZP, Luo YH, 2008. Impact of low temperature storage on survival and fecundity of *Ophraella communa* LeSage (Coleoptera: Chrysomelidae). *Chinese Journal of Biological Control*, 24(4): 376 - 378. [周忠实, 郭建英, 万方浩, 陈红松, 彭兆普, 罗源华, 2008. 低温冷藏对豚草天敌广聚萤叶甲存活和生殖力的影响. 中国生物防治, 24(4): 376 - 378]

(责任编辑: 赵利辉)